

## **Wykaz skrótów do rozdziału 8**

ES<sup>•</sup> – rodnik tyłowy ergotioneiny

ESH – ergotioneina

ESSE – disulfid ergotioneiny

GSH – glutation zredukowany

Hb – hemoglobina

HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa

Mb – mioglobina

NMR – jądrowy rezonans magnetyczny

RFT – reaktywne formy tlenu



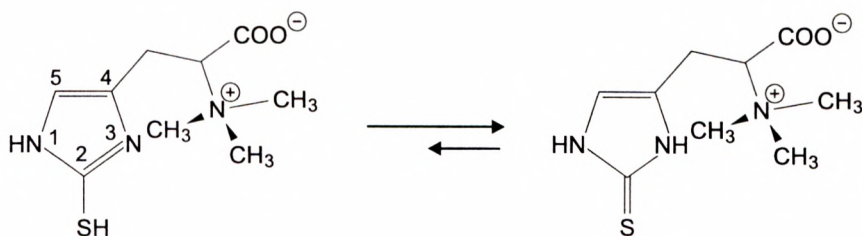
## 8. ERGOTIONEINA

### Występowanie i właściwości biologiczne

Ewa Luchter-Wasylewska

#### 8.1. Wprowadzenie

L-Ergotioneina (ryc. 1), czyli kwas 2-N,N,N-trimetylo-amino-3-(4-imidazolino-2-tion)-propionowy ( $C_9H_{15}O_2N_3S$ ), jest naturalnie występującą, szeroko rozpowszechnioną w przyrodzie pochodną L-histydyny [1, 2]. Powstaje w organizmach niższych eukariotów: grzybów, takich jak buławinka czerwona, czyli sporysz (*Claviceps purpurea*), pleśni, takich jak czerwona pleśń chlebową, czyli rdza zbożowa (*Neurospora crassa*) oraz pewnych mykobakterii. Biosynteza ergotioneiny prawdopodobnie prowadzi z histydyny, metioniny oraz cysteiny, przez 2-tiolohistydynę i hercyninę (N,N,N-trimetylo-histydyna). Ergotioneina jest gromadzona w tkankach grzybów i stanowi główny składnik puli związków tiolowych, osiągając stężenie milimolowe [1–3].



Ryc. 1. Tautomeryczne formy ergotioneiny: iminotiolowa (tiolowa) i tioamidowa (tionowa) [2, 29, 31]

Ergotioneina nie jest wytwarzana przez rośliny wyższe i zwierzęta. Jest ona pobierana z gleby przez korzenie roślin, a następnie z pokarmem roślinnym jest wprowadzana do organizmów zwierząt, takich jak ssaki, ptaki, kraby i żaby [1–4]. Ergotioneina asymilowana przez zwierzęta nie jest degradowana, lecz jest przechowywana przez długi okres w ich tkankach; jej obecność została potwierdzona z zastosowaniem nowoczesnych metod fizykochemicznych, takich jak HPLC i NMR. Półokres życia ergotioneiny szczura wynosi 1 miesiąc [2].

Ergotioneina została po raz pierwszy wyizolowana i wykrystalizowana przez Tangeta w roku 1909 z ziaren sporyszu, a w roku 1911 została zidentyfikowana przez Barger i Ewinsa jako betaina 2-tiolohistydyny. W roku 1951 Heath, Lawson i Rimington dokonali syntezy ergotioneiny z 2-tiolohistydyny, aminokwasu nie znalezionej w tkankach ssaków [1, 2]. Początkowo ergotioneinie nadawano różne nazwy. Hunter i Eagles krystaliczną substancję wyizolowaną z krwi świni nazwali „sympektotinem”, natomiast Benedict „tiazyną” [1, 2]. Ergotioneina dawniej nazywana była też „tioneiną”, ale obecnie taką nazwę mają białka wiążące metale, np. miedź lub cynk [1, 2, 5].

W organizmach zwierząt ergotioneina jest gromadzona w wątrobie, soczewce oka, erytrocytach, płynie nasiennym, płucach, śledzionie, mięśniu sercowym i szkieletowym, nerkach i szpiku kostnym w stężeniu milimolowym, zaś w centralnym systemie nerwowym w stężeniu mikromolowym [1–4, 6–15].

Poziom ergotioneiny różni się znacznie pomiędzy tkankami danego organizmu. Dla danej tkanki zależy od rodzaju organizmu i od jej poziomu w diecie [2, 6–9]. Część tkankowej ergotioneiny może być związana z białkami [2, 9, 11, 16]. Zawartość ergotioneiny we krwi utrzymuje się na stałym poziomie, charakterystycznym dla danych gatunków zwierząt i okolicy, w której te zwierzęta żyją [6, 8]. W ludzkiej krwi jest jej nie więcej niż 2 mg/100 ml, ale w świńskiej aż 26 mg/100 ml [1]. Poziom ergotioneiny w erytrocytach jest dużo wyższy niż w surowicy, co oznacza, że erytrocyty utrzymują wewnątrzkomórkowy poziom ergotioneiny przeciw gradientowi stężeń [12, 16]. Stężenie ergotioneiny w młodych erytrocytach jest wysokie i obniża się powoli z wiekiem erytrocyta [2, 12, 17]. Ergotioneina wprowadzana jest do erytrocytów jedynie podczas erytropoezy [2]. Poziom ergotioneiny w erytrocytach może ulec zmianie w stanach patologicznych: w cukrzycy jest on podwyższony, zaś w chorobach tarczycy jest obniżony [18]. W wątrobie stężenie ergotioneiny jest 10 razy wyższe niż we krwi, co świadczy o tym, że komórki wątroby są zdolne do jej zagęszczania. Mechanizm tego procesu nie jest znany; prawdopodobnie ergotioneina pobierana jest przez białko transportujące [9, 12]. Ergotioneina przechodzi barierę łożyska; jest też znajdowana w mleku zwierząt wchłaniających ją z pokarmem. Również białko jaja zawiera ergotioneinę, prawdopodobnie dla dostarczenia jej płodowi [2, 17].

Ergotioneina jest cennym metabolitem grzybów, który wprowadzony do komórek roślin i zwierząt może pełnić funkcję antyoksydacyjną, antymutagenną oraz chemo- i radioprotekcyjną. Działa ona ochraniająco zarówno na grzyby, czyli organizmy syntetyzujące ją, jak również na rośliny i zwierzęta, pobierające ją z pożywieniem [1, 2, 11, 12, 16, 17, 19–28].

## 8.2. Właściwości chemiczne ergotioneiny

L-Ergotioneina (kwas 2-N,N,N-trimetylo-amino-3-(4-imidazolino-2-tion)-propionowy), czyli betaina 2-tiolohistydyny (ryc. 1), jest reaktywnym, biologicznie czynnym związkiem chemicznym. W fizjologicznym pH, alifatyczny łańcuch ergotioneiny zawiera dodatkowo naładowany czwartorzędowy atom azotu grupy betainowej oraz ujemnie naładowany anion karboksylanowy ( $pK_a=1,34$ ). Do atomu węgla C2 heterocyklicznego pierścienia imidazolu przyłączona jest grupa tiolowa, która w wyniku tautomerii tioamidowo-iminotiolowej fragmentu pierścienia 2-tiokarbonyłowego imidazolidyny,

pozostaje w tautomerycznej równowadze z formą tionową (tioamidową), z przewagą tej ostatniej [2, 24, 29–31].

Pierścień imidazolowy ergotioneiny, podobnie jak innych 2-tiolo-imidazoli, absorbuje światło ultrafioletowe ( $\epsilon_{258\text{ nm}}=14500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [29],  $\epsilon_{258\text{ nm}}=15600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [30],  $\epsilon_{257\text{ nm}}=14000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [31]). Ergotioneina posiada zdolność wygaszania fluorescencji indolu, 20–100 razy silniejszą niż inne imidazolo-2-tiony, takie jak etylenotiomocznik i tioetylamina [28].

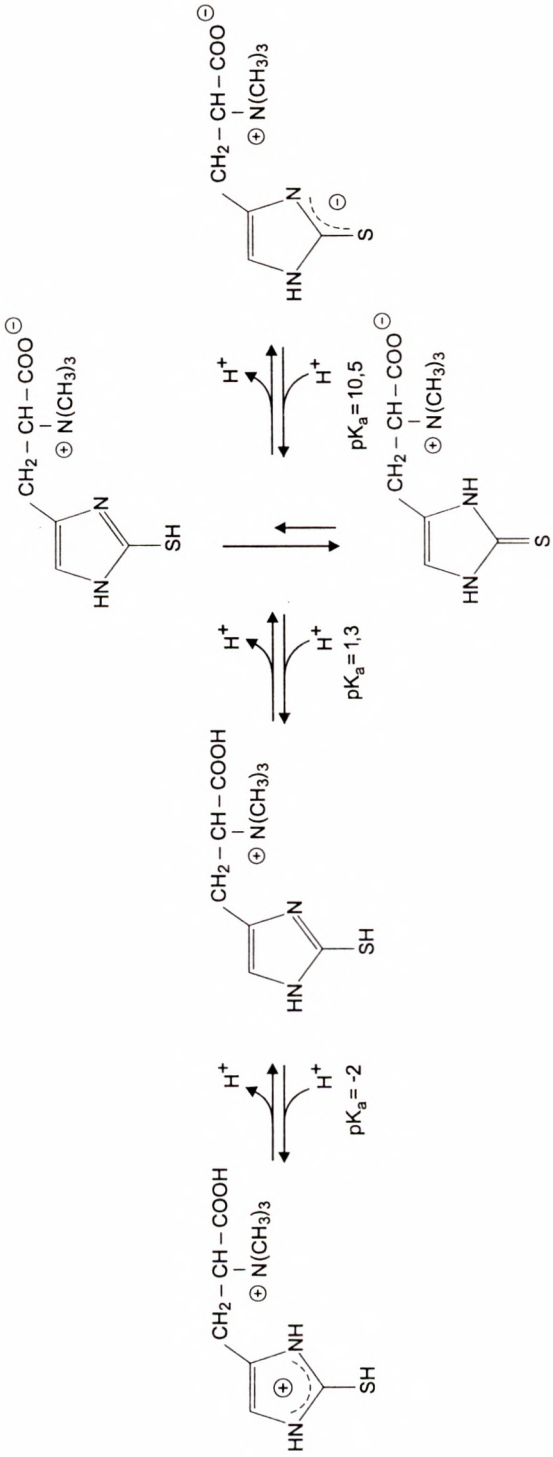
Ergotioneina wykazuje równocześnie własności chemiczne związków iminotiolowych (tiolowych), jak i tioamidowych (tionowych), wynikające z równowagi pomiędzy formą tiolową i tiokarbonylową. W związku z tym, podobnie jak alifatyczne związki tiolowe, reaguje ona z jodoacetamidem, p-chlorobenzoesanem rtęci (pCMB) i bromobimanem; nie reaguje natomiast z takimi odczynnikami tioli, jak kwas 5,5'-ditiohis-bis-nitro-benzoowy (DTNB) i N-etylomaleimid (NEM). Odmienne jak związki tionowe, takie jak tiomocznik i jego pochodne, nie reaguje ona z odczynnikami Grote'a. Ergotioneina nie może reagować z ninhydryną i innymi odczynnikami grup aminowych, ponieważ nie posiada wolnej pierwszorzędowej grupy aminowej. Nie reaguje też z odczynnikiem Pauly'ego, charakterystycznym dla pierścienia imidazolowego, gdyż do uczestniczącego w tej reakcji atomu C2 pierścienia przyłączony jest atom siarki [2, 9, 11, 17, 29, 32].

Grupa tiolowa ergotioneiny ma słabszy charakter kwasowy niż grupa tiolowa związków alifatycznych, takich jak cysteina i glutation. Tiolan ergotioneiny (ryc. 2) tworzy się dopiero w roztworach silnie zasadowych; wartości  $\text{pK}_a$  grupy tiolowej ergotioneiny, cysteiny i glutationu wynoszą odpowiednio 10,5; 8,37 i 9,2 [2, 30, 31, 33, 34].

Atom siarki ergotioneiny, podobnie jak innych tioamidów (takich jak 2-tioketimidazol, tiomocznik i tioacetamid), wykazuje wysoką reaktywność nukleofilową, wyższą niż atom siarki alifatycznych związków tiolowych. Reaktywność ta ujawnia się nawet w postaci obojętnej (poniżej  $\text{pK}_a$  grupy tiolowej), podczas gdy alifatyczne związki tiolowe wykazują słabe własności nukleofilowe jedynie w postaci anionowej (powyżej  $\text{pK}_a$ ). Nukleofilność atomu siarki ergotioneiny związana jest z polaryzowalnością atomu siarki i, podobnie jak w przypadku aminotionów, pochodzi z mezomerycznego uwalniania wolnej pary elektronów elektroujemnego atomu azotu, sąsiadującego z siarką [31].

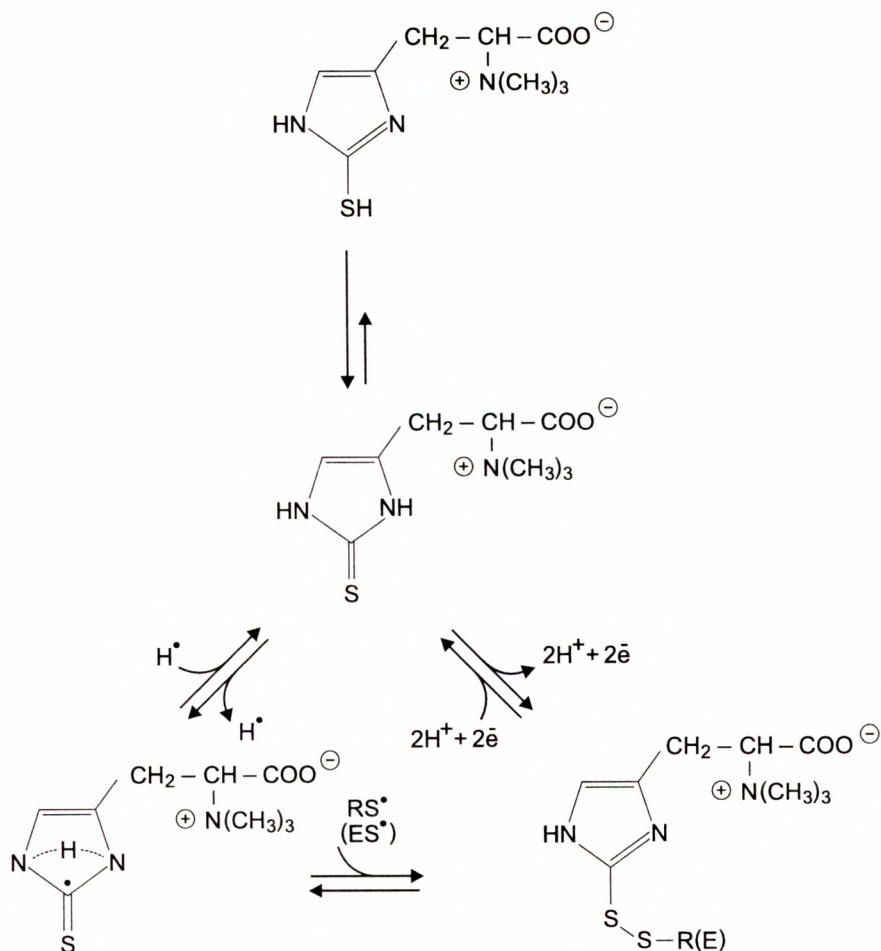
Jako reaktywny nukleofil, ergotioneina reaguje ze związkami elektrofilnymi, a wśród nich z mutagenami oraz z dwuwartościowymi kationami metali przejściowych (jon żelaza, miedzi, rtęci, cynku, kadmu, kobaltu i niklu). Trwale kompleksy wiążą 2 mole ergotioneiny z 1 molem jonu metalu. Zdolność chelatowania jonów, takich jak miedź i żelazo, pozwala ergotioneinie przeciwdziałać uszkodzeniom oksydacyjnym w różnych tkankach [2, 12, 14, 16, 17, 19, 22, 26].

Ergotioneina bierze udział w jedno- i dwuelektronowych reakcjach utlenienia oraz w reakcjach redukcji (ryc. 3). Wartość standardowego potencjału redoks  $E^0$  (w pH 7,0) dla dwuelektronowej reakcji odwodorowania grupy tiolowej/tionowej ergotioneiny z utworzeniem disulfidu (ESSE/ESH) wynosi  $-0,06\text{ V}$  [2, 11, 28, 35]. Jest ona wyższa (tab. 1) niż wartość  $E^0$  dla dwuelektronowych reakcji odwodorowania alifatycznych związków tiolowych, takich jak cysteina, glutation i liponian [33, 34]. Jest natomiast niższa niż wartość  $E^0$  dla wielu innych reakcji odwodorowania. Wartości potencjału  $E^0$  dla jednoelektronowych reakcji odwodorowania ergotioneiny (ESH/ES $^{\cdot}$



Ryc. 2. Jonizacja ergotioneiny: azot N3 imidazolu ( $pK_a = -2,0$ ), grupa karboksylowa ( $pK_a = 1,3$ ) oraz grupa tiolowa ( $pK_a = 10,5$ ) [30, 31]

oraz ES<sup>•</sup>/ESSE) nie zostały do tej pory wyznaczone i wydaje się, że analogicznie jak w przypadku związków takich jak glutation i askorbinian (tab. 1), są one wyższe niż dla reakcji dwuelektronowej.



Ryc. 3. Reakcje utleniania i redukcji, w których uczestniczy ergotioneina [11]

Własności antyoksydacyjne (redukcyjne) ergotioneiny (ESH) wynikają z faktu, że może ona dwuelektronowo redukować (ryc. 3) związki utleniające (związki o wyższym potencjale  $E^{0'}$ ), z równoczesnym utworzeniem symetrycznych (homo-) lub mieszanych disulfidów ergotioneiny (ESSE, ESSR). Ergotioneina (ESH) może też jednoelektronowo redukować inne związki (takie jak nadtlendioazotyn oraz rodnik  $\text{OH}^{\bullet}$  i askorbylowy) z utworzeniem rodnika tyłowego ( $\text{ES}^{\bullet}$ ). Rodnik ten może ponownie zostać zredukowany do ESH, albo w reakcji z drugim rodnikiem tyłowym ( $\text{ES}^{\bullet}$ ,  $\text{RS}^{\bullet}$ ) może utworzyć disulfidy (ESSE, ESSR), bądź też może reagować z innymi wolnymi rodnikami. Przykładem jednoelektronowej redukcji rodnika tyłowego ergotioneiny może być jego reakcja z askorbinianem [11, 12, 36].

Wartości standardowego potencjału redoks ( $E^0$ ) reakcji jedno- i dwuelektronowych [32, 33]

Układ	$E^0$ [V]
GSSG/GSSG <sup>•</sup> (glutation)	-1.50
Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	-0.77
Fe <sup>3+</sup> -cytrynian/Fe <sup>2+</sup> -cytrynian	-0.33
O <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	-0.33
NAD(P) <sup>+</sup> /NAD(P)H	-0.32
Dihydroliponian/liponian	-0.32
GSSG/GSH (glutation)	-0.24
CSSC/CSH (cysteina)	-0.22
FAD/FADH <sub>2</sub>	-0.06
<b>ESSE/ESH (ergotioneina)</b>	<b>-0.06*</b>
Dehydroaskorbinian/askorbinian	-0.06
Mioglobina-Fe <sup>3+</sup> / Mioglobina-Fe <sup>2+</sup>	+0.05
Hemoglobina-Fe <sup>3+</sup> /Hemoglobina-Fe <sup>2+</sup>	+0.15
Ask <sup>•</sup> (rodnik askorbylowy)/askorbinian	+0.28
O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+0.30
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /OH <sup>•</sup>	+0.32
L <sup>•</sup> , H <sup>•</sup> (rodnik wielonienas. kw. tłuszcz.)/l.H	+0.60
O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	+0.82
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	+0.87
GS <sup>•</sup> /GS <sup>-</sup> (glutation)	+0.92
CS <sup>•</sup> /CS <sup>-</sup> (cysteina)	+0.92
O <sub>2</sub> /HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	+1.00
ROO <sup>•</sup> /ROOH	+1.00
NO <sup>•</sup> /NO <sup>+</sup>	+1.21
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	+1.32
ONOOH/NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	+1.40
RO <sup>•</sup> /ROH	+1.60
OH <sup>•</sup> /H <sub>2</sub> O	+2.31

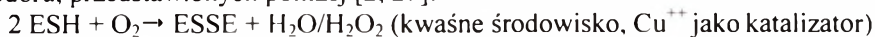
\* [2, 11, 28]

Disulfid ergotioneiny (ESSE), powstały w procesie redukcji związków utleniających, może zostać dwuelektronowo zredukowany przez związki redukujące (związki o niższym potencjale  $E^0$ ), na przykład przez cysteinę lub glutation [29]. Utworzony w tej reakcji utleniony glutation (GSSG) może zostać ponownie zredukowany działaniem reduktazy glutationowej, z użyciem NADPH jako koenzymu [11, 22]. Disulfid ergotioneiny może też zostać jednoelektronowo zredukowany podczas radiolizy pulsacyjnej w obecności askorbinianu [36].

We krwi, w obecności nadmiaru GSH, ergotioneina występuje jedynie w postaci zredukowanej, podobnie jak w wodnym roztworze o fizjologicznym pH. Natomiast w roztworze kwaśnym występuje w postaci mieszaniny tiolu i disulfidu [12]. W porównaniu z alifatycznymi tiolami, ergotioneina nie jest łatwo samoutlenialna, gdyż samorzutnie nie może tworzyć disulfidów. Aby usunąć atom siarki ergotioneiny, niezbędny jest poważny stres oksydacyjny [2, 12, 17, 29].



Disulfid ergotioneiny, nietrwały w roztworach wodnych i alkalicznych, może być utworzony w chemicznych reakcjach utlenienia ergotioneiny tlenem i nadtlaniem wodoru, przedstawionych poniżej [2, 29]:



### 8.3. Metody ilościowego oznaczania ergotioneiny

Dotychczas opracowano kilka metod ilościowego oznaczania ergotioneiny w roztworach wodnych i w płynach fizjologicznych [32, 37–41].

Metoda Huntera [32, 37] oparta jest na reakcji ergotioneiny z odczynnikiem diazo (kwas sulfanilowy z azotanem (III) sodu) w roztworze zasadowym. Absorbancja purpurowego produktu reakcji jest mierzona przy długości fali 495–530 nm (maksimum przy 510 nm). Tioloimidazole i tiolourokianiany, podobnie jak ergotioneina, tworzą purpurowy produkt reakcji. Z oznaczeniem ergotioneiny interferują ponadto fenole, tyrozyna, histydyna i kwas moczowy, tworzące barwne produkty z odczynnikiem diazo. Cysteina i zredukowany glutation hamują natomiast pojawianie się barwy purpurowej w reakcji ergotioneiny z odczynnikiem diazo. Metoda Huntera została zastosowana do oznaczania ergotioneiny w kulturze grzybów, we krwi i w nasieniu [3, 6, 7, 8, 10, 15, 18, 37, 42].

Metoda Jocelyna [38] polega na ogrzewaniu ergotioneiny z 50% KOH w 100°C z utworzeniem tiolourokiananu i trimetyloaminy [3, 39], która w reakcji z kwasem pikrynowym w benzenie tworzy pikrynian, oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm. Metoda nie jest pracochłonna i może być stosowana do oznaczania ergotioneiny we krwi i innych tkankach. Hercynina obecna w próbce daje wyniki podwyższone.

Spektrofotometryczna metoda Carlssona [39] opiera się na reakcji ergotioneiny z nadmiarem disulfidu 2,2'-dipirydyłu w pH 1,0, ze stechiometrycznym uwalnianiem barwnego 2-tiolo-pirydonu, którego absorbancja jest mierzona przy długości fali 343 nm. Substancje interferujące, takie jak związki tiolowe i askorbinian, utleniane są w roztworze zasadowym w obecności soli miedzi (II) jako katalizatora; ergotioneina jest odporna na utlenianie w tych warunkach. Aby przeprowadzić oznaczenie ergotioneiny w hemolizacie krwi, musi on uprzednio zostać odbiałczany poprzez ogrzewanie w roztworze alkalicznym. Disulfid 4,4'-dipirydyłu jest natomiast stosowany do spektrofotometrycznego miareczkowania ergotioneiny [39]. Mitsuyama [12] zmodyfikował metodę Carlssona [39] oznaczenia ergotioneiny we krwi, upraszczając i skracając procedurę. Umożliwia ona ilościowe oznaczenie ergotioneiny w zakresie stężeń od 2,5 do  $80 \cdot 10^{-6}$  M.

Metoda Faheya [40] polega na reakcji związków tiolowych z monobromo-trimetylo-ammonio-bimaniem w obojętnym pH, z utworzeniem fluoryzujących pochodnych, które następnie są poddawane rozdziałom chromatograficznym, elektroforetycznym lub z użyciem elektrochromatografii dwuwymiarowej. Metoda ta pozwala na jakościowe i ilościowe oznaczanie związków tiolowych, wśród nich ergotioneiny.

Kuninori i Nishiyama [41] przygotowali metodę pozwalającą na szybkie i czułe ilościowe oznaczenie pikomolowych ilości związków tiolowych, wśród nich ergotione-

iny. Metoda polega na rozdzieleniu badanej mieszaniny z zastosowaniem techniki HPLC i elektrochemicznej detekcji jonów srebra, pozostających po reakcji ze związkiem tiolowym. Disulfidy oznaczane są jako pochodne tiolowe, powstałe po redukcji siarczynem lub elektroredukcji.

#### 8.4. Właściwości biologiczne ergotioneiny

Ergotioneina jest związkiem mało znanym w środowisku biologów, biochemików, farmaceutów i lekarzy. Powodem takiego stanu jest trudność jej wykrywania i ilościowego oznaczania, wynikająca z jej niezwykłych właściwości chemicznych. Rola fizjologiczna ergotioneiny nie została dotychczas dokładnie poznana i nadal wymaga wyjaśnienia.

W zależności od warunków środowiska, ergotioneina może istnieć w wielu różnych postaciach: jako iminotiol (tiol), pozostający w równowadze z formą tioamidową (tionową) (ryc. 1), jako tiolan (ryc. 2), jako disulfid oraz jako wolny rodnik tylowy (ryc. 3). Każda z tych postaci ma inną reaktywność chemiczną i wynikające z niej właściwości biologiczne [2, 11, 12, 24, 28–31, 36].

Wydaje się, że głównym zadaniem biologicznym ergotioneiny jest wychwytywanie nadtlenu wodoru, wolnych rodników oraz elektrofilnych cząsteczek mutagenów, jak również chelatowanie jonów  $\text{Cu}^{++}$  i  $\text{Fe}^{++}$  [2, 22, 24, 26]. W ten sposób może ona ochraniać komórki i tkanki przed działaniem toksycznych substancji utleniających i mutagennych, jonów metali, nadtlenu wodoru i wolnych rodników [2, 17, 19, 22]. Ergotioneina jest zdolna zmniejszać uszkodzenia spowodowane napromieniowaniem, niedotlenieniem po transplantacji organów oraz udarach serca i mózgu, jak również może ochraniać przed działaniem cytostatyków [2, 24, 17, 23, 27, 36, 43]. Przypuszcza się, że ergotioneina ponadto działa jako neurotransmitter, czynnik diabetogeny, bierze udział w transporcie kationów, działaniu hormonów tyroidowych, ekspresji i naprawie genów oraz w immunoregulacji [2, 12, 17, 19, 20, 22, 24, 26–28]. Antyoksydacyjna, antymutagenna oraz antykancerogenna obrona tkanek i płynów tkankowych może być modulowana przez uzupełnienie ergotioneiny z diety [17, 19, 26].

Ergotioneina (ESH) ma odmienne właściwości chemiczne i inne spektrum działania niż alifatyczne związki tiolowe obecne w komórce, takie jak glutation i cysteina, gdyż występuje ona głównie w postaci tioamidowej (tionowej), spośród dwu pozostających w równowadze form tautomerycznych: iminotiolowej i tioamidowej (ryc. 1) [2, 29–31]. Stres oksydacyjny nie ma wpływu na poziom ergotioneiny w erytrocytach: nie zachodzi obniżenie poziomu ergotioneiny, gdy erythrocyty traktowane są  $\text{H}_2\text{O}_2$  i gdy obniżany jest poziom GSH [12]. Ergotioneina działa bardziej skutecznie niż GSH erythrocytów oraz jest mniej samoutlenialna niż glutation; jest więc zdolna suplementować GSH w tkankach. Ponadto GSH, aby detoksykować ksenobiotyki wymaga działania S-transferazy glutationylowej, czego nie wymaga ergotioneina [2, 17, 19, 22].

Ergotioneina, z powodu pośredniej wartości standardowego potencjału redoks  $E^0$ , dwuelektronowej reakcji redukcji (tab. 1), może brać udział zarówno w reakcjach utleniania, jak i redukcji, będąc reduktantem lub utleniaczem, w zależności od związku, z którym reaguje. Zatem, może ona być przekaźnikiem elektronów pomiędzy zwią-

kami, które nie są zdolne do reakcji bezpośredniej. Jedno- i dwuelektronowe reakcje utleniania i redukcji pozwalają ergotioneinie integrować antyoksydacyjne szlaki witaminy C i glutationu [11]. Kooperacyjne działanie ergotioneiny i askorbinianu, podobne do wcześniej obserwowanego między witaminą E i askorbinianem, może wyjaśnić biologiczną rolę ergotioneiny [36].

Ergotioneina (ESH) jest antyoksydantem (reduktantem), zdolnym do redukcji (tab. 1) licznych związków oraz wolnych rodników (takich jak  $\text{Fe}^{3+}$  hemoglobiny i mioglobiny, nadtlenoazotyn,  $\text{OH}^\cdot$  i rodnik askorbylowy). Disulfid ergotioneiny (ESSE) może być redukowany (może utleniać) przez związki takie, jak jon  $\text{Fe}^{3+}$ , glutation, cysteina i dihydroliponian oraz zredukowane nukleotydy NADH i NADPH [11, 24, 27, 33, 34, 36].

Chemoprotekcyjna rola ergotioneiny polega na „wyłapywaniu” utleniaczy, czyli redukowaniu ich w reakcjach jednoelektronowych [11, 12, 36]. Ergotioneina jest zdolna do reakcji z wolnymi rodnikami hydroksylu ( $\text{OH}^\cdot$ ), azydki ( $\text{N}_3^\cdot$ ), nadtlenku trichlorometylu ( $\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$ ) i peroksytyrozyny oraz z anionami podchlorynu ( $\text{OCl}^-$ ) i nadtlenoazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ) [2, 24, 11, 12, 17, 26, 27, 36]. Ergotioneina zmiatając nadtlenoazotyn i podchloryn, zapobiega inaktywacji  $\alpha_1$ -antyproteinazy; ochrania tyrozynę przed nitrowaniem; ma ponadto działanie ochronne wobec aminokwasów, takich jak tryptofan, metionina, cystationina i homocystyna [11, 27, 44]. Ergotioneina, wychytując wolne rodniki hydroksylowe, hamuje peroksydację kwasu arachidonowego *in vitro* w wątrobie szczura, zachodzącą działaniem związków hemu i  $\text{H}_2\text{O}_2$  [2, 12, 22, 24]. Zmiataczem rodników hydroksylowych jest również histydyna, która nie jest wykrywana w organizmach żywych, z wyjątkiem niektórych ryb [20].

Ergotioneina wykazuje wysoką reaktywność nukleofilową, znacznie wyższą niż tiole alifatyczne. Reaktywność ta występuje nawet w postaci obojętnej (w pH poniżej  $\text{pK}_a$  grupy tiolowej), podczas gdy związki alifatyczne wykazują własności nukleofilne tylko, gdy są naładowane ujemnie (jako tiolan) [19, 26, 45]. Jedynie grupy tiolowe reszt cysteiny centrum aktywnego pewnych enzymów wykazują reaktywność nukleofilową w pH fizjologicznym, na skutek obniżenia ich wartości  $\text{pK}_a$  w wyniku oddziaływań z resztą histydyny [31, 46]. Ergotioneina ma działanie antymutagenne, gdyż jako reaktywny nukleofil jest zdolna do reakcji z cząsteczkami elektrofilnych związków mutagennych, takimi jak kumen i nitrozoaminy [2, 17, 19, 22, 24, 27, 36].

Ergotioneina, podobnie jak imidazol, chelatuje dwuwartościowe kationy metali przejściowych [2, 17, 19, 22, 24, 27, 36, 47–50]. Poprzez zdolność do kompleksowania jonów może ona przeciwdziałać uszkodzeniom utleniającym. Jony miedzi i żelaza biorą bowiem udział w uszkodzeniach tlenowych, ułatwiając tworzenie rodnika  $\text{OH}^\cdot$ , nadtlenków (wśród nich nadtlenku wodoru), peroksydację lipidów oraz uczestnicząc w nieenzymatycznym utlenianiu endogennych biologicznie czynnych związków, takich jak GSH [2, 17, 19, 21, 22, 24, 26]. Ergotioneina ponadto hamuje alkilację RNA *in vitro* oraz uszkodzanie deoksyrybozy w obecności jonów  $\text{Fe}^{++}$ , zależne od rodnika  $\text{OH}^\cdot$  [2, 4, 22, 24]. Kompleksując jony  $\text{Cd}^{2+}$ , ochrania ona mysz przed teratogennością dootrzewnowo podanego kadmu, zaś chelatując jony rtęci, tworzy kompleks  $\text{ESH-Hg}^{++}\text{-Hb}$  [2, 49]. Ergotioneina wiążąc jony metali, hamuje aktywność metaloproteidów [2, 27]. Podwyższony poziom ergotioneiny, zdolnej do wiązania jonu  $\text{Zn}^{++}$  niezbędnego dla biologicznej aktywności insuliny, mógłby zatem być przyczyną powstawania cukrzycy [2, 18].

Ergotioneina obniża poziom RFT w tkankach, zarówno hamując proces ich powstawania, jak i reagując z nimi oraz utrzymuje prawidłowy stosunek tiol/disulfid [2, 11, 12, 17, 24, 26, 27, 36]. Ergotioneina chroni sporysz, hepatocyty oraz erytrocyty przed cytotoksycznością wywołaną działaniem nadtlenu wodoru, jak również zwiększa przeżywalność przechowywanych *spermatozoa*, ochraniając je przed działaniem nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru jest redukowany działaniem ergotioneiny i GSH, z utworzeniem disulfidów ergotioneiny i glutationu [1, 2, 12, 13, 17, 19, 22].

Ergotioneina ochrania mięsień sercowy przed uszkodzeniem spowodowanym niedotlenieniem oraz działaniem wolnych rodników [2, 17, 23, 25, 43, 49]. Podobnie jak inne związki tiolowe, redukuje ona ferrylnioglobinę (MbIV) do Mb(III), powstałą w wyniku eksponowania deoksyMb(II) lub Mb(III) na działanie nadtlenu wodoru [23]. Redukuje też Hb(IV)O do Hb(III), powstałą w reakcji Hb(II)O<sub>2</sub> z jonem azotynowym, chroniąc erytrocyty przed działaniem ferrylnioglobiny Hb(IV)O, podobnie jak imidazolion i kwas moczowy [2, 25]. Utworzony w tych reakcjach disulfid ergotioneiny może zostać ponownie zredukowany działaniem GSH. Sugeruje się, że para ESH-GSH jest biologicznym reduktantem mioglobiny i ochrania mięsień sercowy przed nagromadzeniem się utlenionych postaci Mb po niedotlenieniu [23, 25].

Ergotioneina hamuje powstawanie tlenu singletowego, wygaszając wzbudzone cząsteczki fotouczulaczy, podobnie jak kwas moczowy, histydyna i tiolohistydyna. Ma ponadto działanie ochronne przed fotochemicznym uszkodzeniem fizjologicznie ważnych związków, podobnie jak histydyna i karnozyna. Nie jest natomiast zdolna do wychwytywania tlenu singletowego [2, 19, 20, 22–24, 28, 51]. Ergotioneina może osłaniać soczewkę oka zwierząt, spożywających dostateczne jej ilości, przed uszkodzeniami oksydacyjnymi oraz przed działaniem światła ultrafioletowego [19, 11, 17, 22, 20, 28, 38].

Ergotioneina ochrania bakteriofagi T4 i P22 przed inaktywacją promieniowaniem gamma, powodującym wytwarzanie nadtlenu wodoru, ponadtlenków i rodnika hydroksylowego [2, 20, 27]. Jej radioprotekcyjne działanie wynika ze zdolności do utleniania cząsteczek i rodników, powstałych w wyniku działania promieniowania. Ergotioneina jest bardziej skutecznym radioreceptorem naświetlenia metmioglobiny promieniami gamma niż cysteina i cysteamina [22].

Trwałość i farmakodynamika ergotioneiny sugerują wiele jej potencjalnych zastosowań. Ergotioneina, podobnie jak inne związki tiolowe, może być stosowana *in vivo* jako lek u ludzi, biorąc udział w ochronie przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, powstającymi w wyniku procesu chorobotwórczego lub w wyniku leczenia chorób [2, 3, 17, 19, 20, 26, 27, 33, 34, 36, 44]. Może ona być używana zarówno podczas oczyszczania enzymów, jak i podczas długoterminowych hodowli komórek ludzkich pozbawionych surowicy, gdy niezbędne jest dodawanie antyoksydantów [2, 17, 23, 24]. Ergotioneina erytrocytów może mieć zastosowanie terapeutyczne w leczeniu malarii i talasemii oraz w leczeniu schorzeń erytrocytów uszkodzonych oksydacyjnie [2, 17, 20, 26]. Ergotioneina podawana w płynie infuzyjnym może ochraniać mięsień sercowy przed uszkodzeniami spowodowanymi ischemią i reperfuzją, zaś podawana pacjentom z zespołem Downa może ponadto pomagać w zmniejszaniu efektów związanych z chorobą i towarzyszącym mu nadmiarem dysmutazy ponadtlenkowej. Hartmanowie [19] sugerują, że ergotioneina okaże się wystarczająco bezpieczna, aby zostać niebawem zaliczona do witamin i aby znaleźć się w aptekach obok witaminy C.



Ovothiol (1-metylo-N,N-dimetylo-4-thiolohistydyna) jest inną obecną w komórkach biologicznie czynną tiolową pochodną histydyny. Ovothiol działa skuteczniej chemoprotekcyjnie, radioprotekcyjnie, antymutagennie i antyoksydacyjnie, w porównaniu z ergotioneiną [36, 52–54].

## 8.5. Podsumowanie

Ergotioneina (ryc. 1–3) jest nietoksyczną, naturalnie występującą pochodną histydyny, syntetyzowaną jedynie przez grzyby i mikroorganizmy, spożywaną przez zwierzęta i ludzi wraz z pokarmem roślinnym [1–3]. Zwierzęta asymilują duży procent ergotioneiny pobranej z pożywieniem i przechowują w wysokim stężeniu przez długi okres w tkankach szczególnie podatnych na stres oksydacyjny, takich jak erytrocyty, płyn nasienny, wątroba, nerki i soczewka oka [2, 17, 21]. Chociaż nie jest ona syntetyzowana przez zwierzęta, nie stwierdzono objawów jej niedoboru [27].

Dawniej ludzie i zwierzęta wzbogacali swój organizm w ten cenny związek, spożywając pokarm zanieczyszczony grzybami wytwarzającymi ergotioneinę. Obecnie pożywienie ludzi jest mniej zanieczyszczane grzybami. Poziom ergotioneiny w pokarmach (zboża, keczup) może być wskaźnikiem zanieczyszczenia grzybami [2, 17].

Ergotioneina ma odmienne własności chemiczne oraz inne spektrum działania niż alifatyczne związki tiolowe, obecne w komórce, takie jak glutation, cysteina i kwas liponowy, gdyż jej grupa tiolowa uczestniczy w tautomerii tioamido-iminotiolowej [2, 17, 19, 22, 31]. Atom siarki ergotioneiny, podobnie jak innych aminotionów, wykazuje wysoką reaktywność nukleofilną, nawet gdy grupa tiolowa/tionowa jest niezdysocjowana w środowisku obojętnym i kwaśnym, podczas gdy alifatyczne związki tiolowe wykazują słaby charakter nukleofilowy jedynie w roztworze zasadowym (powyżej  $pK_a$ ) po oddysocjowaniu protonu [2, 30].

Ergotioneina jest ważnym egzogennym metabolitem komórek: działa antyoksydacyjnie, antymutagennie, chemo- i radioprotekcyjnie, jako wysoce reaktywny reduktor i utleniacz, nukleofil oraz chelator jonów metali [2, 17, 19–22, 26, 36]. Może ona być użyteczna w walce ze stresem oksydacyjnym. Może ochraniać komórki i tkanki przed działaniem toksycznych substancji utleniających i mutagennych oraz jonów metali, nadtlenu wodoru i wolnych rodników, powstających w wyniku chorób oraz ich leczenia [2, 11, 19, 24, 17, 20, 22, 26, 43]. Antyoksydacyjna i antymutagenna obrona tkanek i płynów tkankowych może być modulowana przez uzupełnianie ergotioneiny z diety [17].

Ergotioneina w stężeniach spotykanych *in vivo* jest ochraniającą, nietoksyczną naturalnie występującą cząsteczką, która nie jest łatwa do samoutleniania i która ma wysokie, milimolowe stężenie w tkankach ssaków.

## Literatura

- [1] Mann T. (1964), *Nitrogenous bases: spermine, choline, ergothioneine, guanidines, adrenaline, serotonin and their derivatives*. W: *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Ed. Methuen & Co Ltd. London; John Wiley & Sons Inc., New York, 193–220.
- [2] Hartman P.E. (1990), *Ergothioneine as antioxidant*. Meth. Enz., 186, 310–318.
- [3] Heath H., Wildy J. (1956), *The biosynthesis of ergothioneine and histidine by Claviceps purpurea*. Biochem. J., 64, 612–620.
- [4] Heath H., Rimington C., Glover T., Mann T., Leone E. (1953), *Studies using radioactive sulfur on ergothioneine formation in the pig*. Biochem. J., 54, 606–611.
- [5] Maret W., Jacob C., Valee B.L., Fischer E.H. (1999), *Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1936–1940.
- [6] Hunter G. (1951), *On ergothioneine in blood and diazo-reacting substances in maize*. Biochem. J., 48, 265–270.
- [7] Heath H., Rimington C., Searle C.E., Lawson A. (1952), *Some effects of administering ergothioneine to rats*. Biochem. J., 50, 530–533.
- [8] Baldrige R.C., Lewis H.B. (1953), *Diet and the ergothioneine content of blood*. J. Biol. Chem., 202, 169–176.
- [9] Melville D.B., Horner W.H., Lubschetz R. (1954), *Tissue ergothioneine*. J. Biol. Chem., 206, 221–228.
- [10] Heath H., Rimington C., Mann T. (1956), *Further studies on seminal ergothioneine of the pig*. Biochem. J., 65, 369–373.
- [11] Shires T.K., Brummel M.C., Pulido J.S., Stegink L.D. (1997), *Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues*. Comp. Biochem. Physiol., 117C, 117–120.
- [12] Mitsuyama H., May J.M. (1999), *Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes*. Clin. Sci., 97, 407–411.
- [13] Mann T., Lutwak-Mann C. (1981), *Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids: application to andrological problems*. W: *Male reproductive function and semen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 269–336.
- [14] Shivaji S., Scheit K.H., Bhargava P.M. (1990), *Low-molecular-weight components of seminal plasma*. W: *Proteins of seminal plasma*. John Wiley & Sons Inc., Wiley-Interscience Publication, 29–50.
- [15] Mann T., Short R.V., Walton A., Archer R.K., Miller W.C. (1957), *The tail-end sample of stallion semen*. J. Agric. Sci., 49, 301–312.
- [16] Hartman Z., Hartman P.E. (1992), *Copper and cobalt complexes of carnosine and anserine: production of active oxygen species and its enhancement by 2-mercaptoimidazoles*. Chem. Biol. Inter., 84, 153–168.
- [17] Hartman Z., Hartman P.E. (1987), *Interception of some direct-acting mutagens by ergothioneine*. Env. Mol. Mutagenesis, 10, 3–15.
- [18] Frendo J. (1958), *Ergotioneina krwi ludzkiej w nadczynności tarczycy*. Przegląd Lekarski, 14, 1–9.
- [19] Hartman P.E. (1986), *Interception of toxic agents/mutagens/carcinogenesis: some of the nature's novel strategies*. W: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms*. Eds. Shenkel D.M., Hartman P.E., Kada T., Hollaender A., Plenum Publishing Corporation, 169–179.
- [20] Dahl T.A., Midden W.R., Hartman P.E. (1988), *Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damages*. Photochem. Photobiol., 47, 357–362.
- [21] Hartman P.E., Hartman Z., Citardi M.J. (1988), *Ergothioneine, histidine and two naturally occurring histidine dipeptides as radioprotectors against  $\gamma$ -irradiation inactivation of bacteriophages T4 and P22*. Radiat. Res., 114, 319–330.

- [22] Hartman P.E., Shankel D.M. (1990), *Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules*. *Env. Mol. Mutagenesis*, 15, 145–182.
- [23] Arduini A., Eddy L., Hochstein P. (1990), *The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function of ergothioneine*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 41–43.
- [24] Akanmu D., Cecchini R., Aruoma O.I., Halliwell B. (1991), *The antioxidant action of ergothioneine*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 10–16.
- [25] Arduini A., Mancinelli G., Radatti G.L., Hochdtein P., Cadenas E. (1992), *Possible mechanism of inhibition of nitrite-induced oxidation of oxyhemoglobin by ergothioneine and uric acid*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294, 398–402.
- [26] Hartman P.E., Hartman Z. (1993), *Direct interception of mutagens and carcinogens by biomolecules*. W: *Antimutagenesis and anicarcinogenesis. Mechanism III*. Eds. Bronzetti G., Hayatsu H., DeFlora S., Walters M.D., Shankel D.M., Plenum Press, New York, 351–366.
- [27] Aruoma O.I., Whiteman M., England T.G., Halliwell B. (1997), *Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 231, 389–391.
- [28] Takeshima S., Inuoe T. (1996), *The strong fluorescence-quenching effect of ergothioneine*. *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 201–203.
- [29] Heath H., Toennies G. (1958), *The preparation and properties of ergothioneine disulphide*. *Biochem. J.*, 68, 204–210.
- [30] Stanovnik B., Tisler M. (1964), *Dissociation constants and structure of ergothioneine*. *Anal. Biochem.*, 9, 68–74.
- [31] Carlsson J., Kierstan M.P.J., Brocklehurst K. (1974), *Reactions of L-ergothioneine and some other aminothiiones with 2,2'- and 4,4'-dipyridyl disulphides and of L-ergothioneine with iodoacetamide*. *Biochem. J.*, 139, 221–235.
- [32] Hunter G. (1928), *A new test for ergothioneine upon which is based a method for its estimation in simple solution and in blood-filtrates*. *Biochem. J.*, 22, 4–10.
- [33] Augusto O., Radi R. (1995), *Peroxynitrite reactivity: free radical generation, thiol oxidation and biological significance*. W: *Biothiols in health and disease*. Eds. Packer L., Cadenas E., Marcel Dekker Inc., New York, Hong Kong, 83–116.
- [34] Bartosz G. (1995), *Strategia ataku*. W: *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa, 13–134.
- [35] Romero F., Ordonez I., Arduini A., Cadenas E. (1992), *The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. Redox and addition reactions and formation of thiyl radical intermediates*. *J. Biol. Chem.*, 267, 1680–1688.
- [36] Asmus K.D., Bensasson R.V., Bernier J.L., Houssin R., Land E.J. (1996), *One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C*. *Biochem. J.*, 315, 625–629.
- [37] Hunter G. (1949), *The determination of ergothioneine in simple solution and in blood*. *Can. J. Res.*, 27, 230–239.
- [38] Jocelyn P.C. (1958), *The distribution of ergothioneine in blood as determined by a new method of estimation*. *Biochem. J.*, 70, 656–660.
- [39] Carlsson J., Kierstan M.P.J., Brocklehurst K. (1974), *A convenient spectrophotometric assay for the determination of L-ergothioneine in blood*. *Biochem. J.*, 139, 237–242.
- [40] Fahey R.C., Newton G.L., Dorian R., Kosower E.M. (1980), *Analysis of biological thiols: derivatization with monobromotrimethylammoniumbimane and characterization by electrophoresis and chromatography*. *Anal. Biochem.*, 107, 1–10.
- [41] Kuninori T., Nishiyama J. (1991), *Measurement of biological thiols and disulfides by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection of silver mercaptide formation*. *Anal. Biochem.*, 197, 19–24.
- [42] Melville D.B., Lubschetz R. (1953), *A method for the determination of ergothioneine in blood*. *J. Biol. Chem.*, 200, 275–285.

- [43] Cargnoni A., Bernocchi P., Ceconi C., Curello S., Ferrari R. (1995), *In vitro administration of ergothioneine failed to protect isolated ischaemic and reperfused rabbit heart*. Biochim. Biophys. Acta, 1270, 173–178.
- [44] Whiteman M., Halliwell B. (1997), *Thiols and disulphides can aggravate peroxynitrite-dependent inactivation of  $\alpha_1$ -antiproteinase*. FEBS Letters, 414, 497–500.
- [45] Sen C.K. (2000), *Cellular thiols and redox-regulated signal transduction*. Curr. Top. Cell. Regul., 36, 1–30.
- [46] Zhang Z.Y., Dixon J.E. (1993), *Active site labelling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402*. Biochemistry, 32, 9340–9345.
- [47] Torok I., Surdy P., Rockenbauer A., Korecz L.Jr., Anthony G.J., Koolhaas A., Gajda T. (1998), *Nickel(II)-, copper(II)- and zinc(II)-complexes of some substituted imidazole ligands*. J. Inorg. Biochem., 71, 7–14.
- [48] Kapinos L.E., Song B., Sigel H. (1998), *Metal ion-coordinating properties of imidazole and derivatives in aqueous solution: interrelation between complex stability and ligand basicity*. Inorg. Chim. Acta, 280, 50–56.
- [49] Sigel H., Saha A., Saha N., Carloni P., Kapinos L.E., Griesser R. (2000), *Evaluation of intramolecular equilibria in complexes formed between substituted imidazole ligands and nickel(II), copper(II) and zinc(II)*. J. Inorg. Biochem., 78, 129–137.
- [50] Rabenstein D.L., Isab A.A. (1982), *A proton nuclear magnetic resonance study of the interaction of mercury with intact erythrocytes*. Biochim. Biophys. Acta, 721, 374–384.
- [51] Hartman P.E., Hartman Z., Ault K.T. (1990), *Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and stained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid*. Photochem. Photobiol., 51, 59–66.
- [52] Turner E., Klevit R., Hopkins P.B., Shapiro B.M. (1986), *Ovothiol: a novel thiohistidine compound from sea urchin eggs that confers NAD(P)H-O<sub>2</sub> oxidoreductase activity on ovoperoxidase*. J. Biol. Chem., 261, 13056–13063.
- [53] Marjanovic B., Simic M.G., Jovanovic S.V. (1995), *Heterocyclic thiols as antioxidants: why ovothiol C is a better antioxidant than ergothioneine*. Free Radical Biol. & Med., 18, 679–685.
- [54] Weaver K.H., Rabenstein D.L. (1995), *Thiol/disulfide exchange reactions of ovothiol A with glutathione*. J. Am. Chem. Soc., 117, 1904–1907.